

ヘムオキシゲナーゼ1欠損症1家系における 遺伝子異常ならびに細胞傷害機構の解析

金沢大学医学部医学科小児科学講座 (主任: 小泉晶一教授)

金 田 尚

ヘムオキシゲナーゼ1 (heme oxygenase-1, HO-1) (EC 1.14.99.3) は2種類あるヘムオキシゲナーゼの1つであり、細胞内ヘムをビリベルジン、一酸化炭素および鉄に代謝する律速酵素として作用する。種々の酸化ストレス下で急速に誘導されることで有効な自己防衛機構の1つとして作用すると同時に、体内鉄代謝の恒常性にも重要な役割を果たしている。最近、HO-1ノックアウトマウスの解析によりHO-1活性の欠損が成長障害、酸化ストレスへの脆弱性、貧血、多臓器におよぶ異常な鉄沈着をもたらすことが示された。しかしながらヒト疾患でこれまでHO-1欠損が直接の病因となったものは皆無である。今回、重度の発育遅延と遷延する全身性の炎症をきたした6歳男児において最初のヒトHO-1欠損症を同定し、患者および患者家族のHO-1蛋白発現、HO-1遺伝子変異および酸化ストレスに対する細胞脆弱性を評価した。Epstein-Barr ウイルス形質変換B細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) を用いた免疫組織化学及びイムノブロットングにより、患者由来のLCLではヘミン、塩化カドミウム、亜硫酸など多様な刺激曝露の際、HO-1産生が完全に欠如していることが明らかとなった。さらに正常対照や他の患者家族由来のLCLではヘミン誘導の細胞死に対し完全に抵抗性を示した一方で、患者由来のLCLではヘミンにより誘導される細胞傷害に対して非常に過敏であった。これらはHO-1が酸化ストレス時の細胞防御において重要な役割を果たすことを示唆する。HO-1 mRNAの発現はヘミン刺激後のLCLを使用して逆転写PCR法 (reverse transcribed-PCR, RT-PCR) で検討した。患者では2つの異なったバンドが検出され、PCR産物を用いたダイレクトシーケンス法により、長いバンドは父方対立遺伝子に由来したエクソン3領域内の2塩基対欠失に、短いバンドは母方対立遺伝子に由来した完全なエクソン2スキッピング変異に一致していることが判明した。両変異ともフレームシフトを生じてHO-1蛋白質は早期翻訳終結していた。患者家族の保因者診断はRT-PCRならびに変異特異的PCRを用いてエクソン3領域内の2塩基対欠失、エクソン2スキッピングを各々同定し、患者の姉は父由来の変異対立遺伝子を持つ保因者であることが決定された。いずれの変異対立遺伝子とも100名の非血縁健康者対照群では検出されなかった。これらの結果から患者はHO-1変異の複合ヘテロ接合体と確認され、またHO-1は実験培養細胞内、生体内を問わずストレス誘導による細胞傷害の際に重要な防御的役割を果たしていることが強く示唆された。

Key words heme oxygenase-1, hemin (ferriprotoporphyrin IX chloride), oxidative stress, annexin V, gene mutation.

生物は進化の過程で大気中に大量に存在する酸素を電子受容体として、嫌気性呼吸に比べよりエネルギー生成効率の高い酸化的リン酸化を行うことで地球内環境に適応してきた。同時に細胞内で生成される活性酸素種は白血球の殺菌作用や制癌作用として生体防御機構に利用されるものの、その強力な生物毒性のため僅かの量でもストレスとなり得る。活性酸素種はこれまで動脈硬化や炎症、虚血性心疾患、胃粘膜障害などの疾病のみならず発癌や老化との関連性が知られており、生物は活性酸素種を消去する機構なしには生存できない¹⁾。多様な抗酸化防御機能を有した生物のみが現在まで進化を遂げたのは当然の摂理である。生体内での抗酸化酵素群としては前駆物質を除去するスーパーオキシドジスムターゼ、カタラーゼ、グルタチオンペ

ルオキシダーゼが代表的²⁾であるが、熱ショックファミリーの中にも酸化ストレスにより強く誘導され、傷害部位の構造および機能の保持作用を有するものが存在する^{3,4)}。

ヘムオキシゲナーゼ (heme oxygenase, HO) (EC1.14.99.3) はヘム分解の律速酵素でポルフィリン環への酸素添加によりヘムを開環させ、ビリベルジン、一酸化炭素、鉄が生成される⁵⁾。HOにはHO1型 (HO-1) とHO2型 (HO-2) の2種類が存在するものの、全く異なった単一コピー遺伝子に由来し、ヌクレオチド配列やアミノ酸構成における相同性は極めて低い^{6,8)-11)}。HO-2は構成的に合成され中枢神経系や精巣で優位に存在し、糖質コルチコイド以外のストレス刺激には全く反応しない⁶⁾。最近ではHO-1遺伝子発現の制御⁹⁾や射精⁷⁾への関与が解明されつつ

平成10年11月26日受付, 平成11年1月22日受理

Abbreviations : bp, base pairs; dNTP, deoxyribonucleotide triphosphate; FITC, fluorescein isothiocyanate; HB, hepes buffer; HO, heme oxygenase; IL, interleukin; LCL, lymphoblastoid cell line; PBS, phosphate-buffered saline; RT-PCR, reverse transcribed-PCR; TBS, Tris-buffered saline

あるものの、生理作用は未だ不明な点が多い。一方、HO-1は従来、熱ショックファミリーの一員である熱ショック蛋白32 (heat-shock protein 32) としても知られるストレス誘導型の酸化酵素であり¹²⁾、肝脾などの網内系を中心に体内で普遍的に存在する⁵⁾⁶⁾。HO-1自体には直接の防御作用はなく、酸化ストレスに対しては抗酸化作用や抗炎症作用を有する、ヘム分解の代謝産物であるビリベルジン、一酸化炭素ならびに二次産物であるフェリチンが増生されることで生体防御に働いている^{13)~16)}。通常マクロファージ以外での発現は検出限界以下であるが、ヘミン¹⁷⁾¹⁸⁾、酸化リポ蛋白¹⁹⁾などの酸化ストレスや高熱²⁰⁾だけでなく、亜硫酸¹²⁾に代表される重金属、紫外線¹²⁾や可視光線²¹⁾、炎症性サイトカイン²²⁾、エンドトキシン²³⁾、低酸素²⁴⁾など多種にわたるストレス刺激により短時間で数十倍レベルにまで発現が増強される。これらはHO-1遺伝子のプロモーター領域にHSF (heat-shock nuclear factor), AP-1 (activator protein-1), NF- κ B (nuclear factor κ B)などの制御因子が結合することで説明されている^{25)~28)}。以上からHO-1は他の熱ショックファミリーと同様にストレス下で急速に発現することで生体防御に働いているものと考えられている^{28)~31)}。

最近Possら³²⁾³³⁾はHO-1ノックアウトマウスを作製し、HO-1欠損マウスは一定の週齢を超えると巨大分子群の酸化傷害、組織破壊ならびに慢性炎症を自然に発症すること、また貧血も合併して網内系臓器での食細胞と実質細胞内への鉄沈着をきたすことを報告している。これらの事実よりHO-1欠損は単にストレス応答に対する脆弱性だけでなく、酸化ストレスによって集積した細胞内遊離鉄の排除と再利用の障害が重要であるとしている。しかしながらこれまでヒトHO-1欠損症の報告例はなく、ヒトのストレス応答におけるHO-1の生体防御物質としての役割は不明な点が多い。

今回、2歳2ヶ月時より強い血管内皮傷害を伴った原因不明の慢性炎症が持続し、貧血、低ビリルビン血症、肝腫大を認めている6歳の男児において、HO-1欠損を同定し³⁴⁾、患者および患者家族の細胞レベルでのストレス応答における細胞傷害とHO-1発現との関連性を評価すると同時に、患者の遺伝子レベルでの変異の同定ならびに家族内保因者の診断を試み、患者病態との因果関係を検討した。

対象および方法

I. 対 象

対象は金沢大学医学部小児科にて経過観察中のHO-1欠損症患者およびその家族の1家系である(図1)。患者以外の家族はいずれも健康であり、母親には2度の流産歴がある。後述の検査は全て家族への説明および同意を得た上で実施した。患者病歴は以下の通りである。

患者(図1、II-5)：2歳2ヶ月時に弛張熱と全身性の紅斑の出現があり近医を受診した。明らかな身体発達遅延があり、著明な肝腫大を伴っていたが脾臓は触知されなかった。腹部超音波検査と^{99m}Tcコロイドシンチグラフィーから無脾症と確認された。血液検査では著明な白血球増多(51,600/ μ l)、血小板増多(2,260,000/ μ l)、血液凝固線溶系の亢進(フィブリノゲン109 mg/dl、フィブリノゲン分解産物Dダイマー186.1 μ g/dl、トロンビン-アンチトロンビンIII複合体202.2 μ g/L、プラスミン- α_2 プラスミンインヒビター複合体22.3 mg/dl、von Willebrand 因子活性580%、トロンボモジュリン12 FU/ml)お

よびWHO分類でのV型高脂血症(血清総コレステロール552 mg/dl、トリグリセリド638 mg/dl)を認めた。血清フェリチン(780 ng/dl)、乳酸脱水素酵素(17,740 IU/L)、アスパラギン酸アミノ基転移酵素(442 IU/L)は共に上昇していたが、アラニンアミノ基転移酵素は正常範囲内であった。一方、小球性低色素性貧血(赤血球 $1.48 \times 10^6/\mu$ l、ヘモグロビン濃度4.9 g/dl)が持続し血清ハプトグロビン濃度の上昇(878 mg/dl)を認めていたのに対して、血清ヘム濃度は異常高値(490 μ M)を、血清総ビリルビンは低値(0.1-0.3 mg/dl)を推移していた。経過中にCoombs試験が数回施行されたが直接、間接共に常に結果は全て陰性であった。インターロイキン(interleukin, IL)-6は軽度高値を示したが、他の血清サイトカインはIL-2、腫瘍壊死因子 α (tumor necrosis factor- α)、インターフェロン γ (interferon- γ)はいずれも正常範囲内であった。また紹介医入院時に開腹肝ならびに腎生検が施行された。肝組織ではグリソン鞘への軽度リンパ球浸潤を認めたのみで線維化や脂肪変性などは著明でなかった。腎組織では糸球体は軽度メサンギウム基質増殖を認めるのみであったが、透過電子顕微鏡像では基底膜からの血管内皮細胞解離と内皮細胞下の沈着物を認めた。ベルリン青による鉄染色では腎尿管、肝実質細胞ならびにKupffer細胞に鉄沈着を認めた。開腹生検時に左季肋下には瘢痕病変を認めたが脾臓とは同定困難であった。当科初診時から経口ステロイド剤、非ステロイド性抗炎症剤の投与と定期的な輸血による治療が行われ、溶血性貧血の進行抑制までには至らなかったが全身の炎症反応は比較的良好にコントロールされ、重篤な感染の合併もなく経過していた。しかし発症から4年が経過した時点で慢性硬膜下血腫を併発した。穿頭洗浄術は成功したが、術後経過中に感染の合併に続いて、突如心臓停止をきたし、死亡した。患者は病理解剖を行い、現在死亡原因を究明している。

II. 方 法

1. Epstein-Barr ウイルス形質変換B細胞株 (lymphoblastoid cell line, LCL) の樹立

インフォームドコンセントを得た患者、その家族および3名の健常者よりヘパリン加末梢静脈血よりフィコール-ハイパーク(Ficoll-Hypaque)比重遠心法にて分離した単核球を

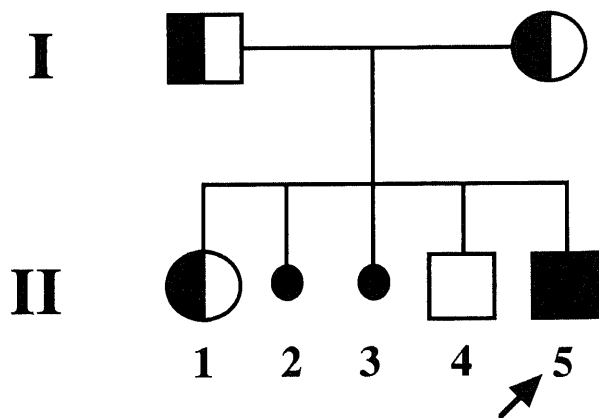


Fig. 1. Pedigree with HO-1 deficiency. The arrow indicates the proband of the pedigree. Circles, females; squares, males; small closed circles, abortions; half-filled, the paternal or maternal heterozygote; filled, the compound heterozygote.

2-アミノエチルイソチオウロニウムブロマイド (2-aminoethylisothiuroniumbromide) (Sigma Chemical Co., St. Louis, USA) 処理ヒツジ赤血球を用いてロゼット法とフィコラーハイパーク比重遠心法により E ロゼット非形成細胞を分離回収した。各々の LCL は E ロゼット非形成細胞に B 95-8 細胞株培養上清を添加して樹立し、さらに限界希釈法³⁵⁾ によるクローニングを行った。

2. ヘミン誘導による HO 蛋白質発現の検討

1) 試料の準備

樹立した LCL は 10% 非働化ウシ胎児血清 (fetal calf serum), 25 mM HEPES, 5×10^{-5} M 2-メルカプトエタノール (2-mercaptoethanol), 100 U/ml ペニシリン G, 10 μ g/ml ゲンタマイシンを含む RPMI1640 培養液 (Gibco Laboratories, Grand Island, USA) に 1×10^5 /ml の割合で浮遊させ、48 穴マイクロタイタープレート (Costar no.3548, Costar, Cambridge, USA) に分注し、ヘミンは (hemin) (Sigma Chemical Co.) を 0.1 mM から 100 mM までの各濃度となるように、また塩化カドミウム (CdCl_2) (和光純薬工業, 大阪), 亜砒酸 (NaAsO_2) (和光純薬工業) は共に 10 mM の濃度となるように添加後、37°C, 5% CO_2 の条件下で 6 時間培養した。またヘミン添加のないものをコントロールとした。

2) イムノプロット

刺激後の各 LCL の細胞数を 1×10^7 個にそれぞれ調節し、リン酸緩衝生理食塩水 (phosphate-buffered saline, PBS, PH7.2) で 1 回洗浄後 10% 三塩化酢酸 (trichloroacetic acid) と混和し、10 分間氷上で静置させた。15,000 rpm \times 5 分で遠心後上層を除去し、沈渣に 9 M 尿素, 2% トリトン (Triton) \times -100, 20% 2-メルカプトエタノール混合液 80 μ l を添加し超音波処理を加えた。20% SDS 20 μ l を添加し混合の後、1 M トリスアミノメタン (Trisaminomethane) を加え中和した。電気泳動は Laemmli の SDS-PAGE 法に準じて³⁶⁾ ゲル濃度が 5% から 20% のポリアクリルアミドゲル (アトー, 東京) を使用し、各試料は加温せずに 25 μ l ずつを泳動した。電気泳動終了後 HORIZBLOT プロテイング装置 (アトー) を用いてニトロセルロース膜 (HybondTM-ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech Inc., Buckingham, UK) に転写し、PBS で溶解した 5% スキムミルク (森永, 東京) を用いて 1 時間ブロッキング処理をした後、0.1% ツィーン 20 加 PBS (PBS-0.1% Tween 20, PBS-T) にて 2,000 倍に希釈したウサギ抗ヒト HO-1 抗体 (Affinity Bioreagents, Golden, USA), あるいは 2,000 倍に希釈したウサギ抗ヒト HO-2 抗体を一次抗体として室温で 1 時間反応させた。PBS-T にて 15 分, 3 回洗浄し、PBS-T にて 20,000 倍に希釈したワサビペルオキシダーゼ標識ロバ抗ウサギ抗体を二次抗体としてさらに 1 時間反応させた。再度 PBS-T にて洗浄後 ECL ウェスタンプロテイング検出試薬 (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) を使用して、高感度ケミルミネッセンスフィルム (HYPERFILMTM-ECLTM, Amersham Pharmacia Biotech Inc.) 上に検出した³⁷⁾。

3) 免疫組織化学

刺激後の各 LCL 5×10^4 個を細胞遠心沈殿装置 Cytospin2 (Shandon Southern Products, Cheshire, UK) を用いてスライドガラス上に遠沈して塗抹標本を作成し、十分風乾させた後 4°C

アセトンで固定した。トリスアミノメタン緩衝生理食塩水 (Tris-buffered saline, TBS, PH7.2) にて洗浄し、25 倍希釈正常ウサギ血清 (DAKO Co., Copenhagen, Denmark) で 30 分間ブロッキング処理後、100 倍希釈のウサギ抗ヒト HO-1 抗体 (Affinity Bioreagents) を一次抗体として室温で 1 時間反応させた。TBS にて 5 分, 3 回洗浄後アルカリフォスファターゼ標識ヒツジ抗ヤギ血清 (TAGO Inc., Burlingame, USA) を二次抗体としてさらに 30 分間反応させた。再度 PBS-T にて洗浄後 Fast red TR salt (Sigma Chemical Co.) にて発色させて観察した。

4) フローサイトメトリー

刺激後の各 LCL 1×10^6 個を PBS で 1 回洗浄後、PBS で調製した 4% パラホルムアルデヒド (paraformaldehyde, ホルマリン) で 4°C, 20 分間固定した。再度 PBS で 2 回洗浄して 0.1% トリトン X-100 に 5 分間浸透させた後、一次抗体としてウサギ抗ヒト HO-1 抗体 (Affinity Bioreagents) を添加し 4°C, 30 分間反応させた。さらに PBS で 2 回洗浄後、二次抗体としてフルオレッセン・イソチオシアン酸 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 標識抗ウサギ抗体を添加し 4°C, 30 分間染色した。約 1 ml の PBS に再浮遊しフローサイトメーター Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System, 東京) を用いて、細胞 5,000 個ずつにおける HO-1 発現を解析した。尚、正常ウサギ血清 (DAKO, Glostrup, Denmark) を対照として用いた。

3. 各種ストレス誘導下での細胞傷害解析

各 LCL がトリパンプルーによって生存率が 90% 以上であることを確認したうえで、上記培養条件下でヘミンおよび塩化カドミウムの各誘導物質を添加して 24 時間培養し、培養終了後 FITC 標識アネキシン V (annexin V) 結合を用いたフローサイトメトリー法を用いて生存率を算出した。PBS にて洗浄後、 1×10^6 個/ml の濃度で 100 ml のアネキシン V 結合解析用ヘパス緩衝液 (Hepes buffer, HB; 20 mM ヘパス, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl_2 , 2.5 mM CaCl_2 , 1.2 mM $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 12$ 水和物, 0.5% ウシ血清アルブミン) に再浮遊し、500 倍希釈 FITC 標識アネキシン V (Bender Med, Vienna, Austria) を添加後室温暗所で 15 分間反応させた。さらに HB で 10 倍希釈後フローサイトメーター Cytoron Absolute (Ortho Diagnostic System) にて細胞 5,000 個ずつ解析した。前方散乱と FITC 蛍光の 2 パラメーター解析により細胞の生死を判定し³⁸⁾、無刺激培養での生存細胞数を 100% として各刺激物質添加培養での生存率を算出した。

4. HO-1 遺伝子の解析

1) 核酸抽出用試料の準備

樹立した LCL は前述の培養条件下で増殖後、0.1M PBS で 2 回洗浄したものを試料とした。これとは別に RNA 抽出用には 10 分の 1 容の 1mM 亜砒酸を培養液に添加して 3 時間培養したものを使用した。一方、死産した同胞 (図 1, II-3) に関してはホルマリン固定、パラフィン包埋処理済みの剖検標本だけが現存していたため、腎組織より DNA 抽出のみを行った。また本症例で確認された遺伝子変異の一般出現頻度算定の目的で 100 名の非血縁である当院外来患者からインフォームドコンセントを得た上で EDTA 加末梢静脈血を採取した。得られた全血のうち 200 μ l はそれぞれ 96 穴マイクロタイタープレート (Corning

Glass Works, Corning, USA) に分注し, LCLと同様に1 mM亜硫酸10 μ lを添加した上で3時間培養後直ちにRNA抽出を行った. 残りの全血には等量の1%デキストランを加えてよく転倒混合後室温で30分静置し, 分離した上層を別の試験管に移し取り, 1,500 rpm \times 5分の遠心で白血球分画を回収した. 混入した赤血球は0.2%食塩水を加えて攪拌により溶血させ除去し, 10分の1容の1.785%食塩水を加えて等張とした後で, 再度遠心により白血球分画を回収したものをPBSで1回洗浄し, これをDNA抽出用試料とした.

2) 核酸の抽出

LCLおよび末梢白血球は各々 2×10^7 個をPBS 1 mlに再浮遊させ, 10mg/mlのプロテナーゼK (和光純薬工業) 100 μ lを添加後, DNA/RNA/プラスミド抽出システムモデル341 (Perkin - Elmer Applied Biosystems Division, Norwalk, USA) にて各細胞より染色体DNAを抽出した. ホルマリン固定組織は3mm立方に細片化したものに $1 \times$ 細胞溶解用緩衝液 (lysis buffer, Perkin - Elmer Applied Biosystems Division) 500 μ l, 10mg/mlのプロテナーゼK 50 μ lを加えて恒温槽で50 $^{\circ}$ C, 48時間加温した. 完全溶解後にフェノール/クロロホルム抽出とエタノール沈澱を行った. いずれも得られたDNAは $1 \times$ TE緩衝液 (10mM トリスアミノメタン, 1mM EDTA, pH 6.8) に溶解して一部を取り, 260nmの吸光度を測定してDNA濃度を計算した.

mRNAの抽出精製にはChomczynskiら³⁹⁾の酸グアニジニウム-フェノール/クロロホルム法とPharmacia Biotech P-L Biochemicalsのオリゴ (dT) セルローススピンカラム法とを組み合わせたQuickPrep[®] mRNA抽出キット (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) を使用した. 亜硫酸刺激後のLCL 1×10^6 個もしくは全血25 μ lから得られたmRNAを含む抽出液を

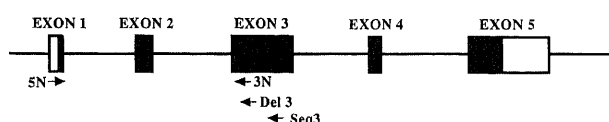


Fig. 2. Structural organization of HO-1 gene and the dispositions of PCR primers for mutational analysis. Coding regions are indicated by shaded boxes.

エタノール沈澱の後, $1 \times$ TE緩衝液に溶解してDNAと同様にmRNA濃度を計算した.

3) PCRプライマーの作成

HO-1およびHO-2のcDNA塩基配列はゲノムデータベース (Genome Data Base, Baltimore, USA) または文献¹⁸⁾ から引用した. 今回HO-1遺伝子の翻訳領域のうち, エクソン1からエクソン3領域までの上流域ではHO-2遺伝子との相同性が特に低いことに注目して独自にPCRプライマーを設計し, 合成はフナコシ (東京) に委託した. 図2, 表1に使用したPCRプライマーの部位, 塩基配列, PCR産物の大きさを一覧にして示す. このうちDel 3は後述する父親型変異配列に特異的なプライマーであり, 正常配列特異的な3Nと組み合わせて父親型変異配列の検出にはAmplification refractory mutation system 法⁴⁰⁾を用いた.

4) PCRおよび逆転写PCR法 (reverse transcribed-PCR, RT-PCR)⁴¹⁾⁴²⁾

RT-PCRにはReady-To-GoTM RT-PCR ビーズ (Amersham Pharmacia Biotech Inc.) を使用した. 即ちmRNA 0.5 μ gを鋳型としてランダムプライマー法にて1本鎖cDNAを合成し, 続いて同一チューブ内にPCRプライマーを加えた後にPCRを行うものである. まずキットの200 μ l容量チューブ内にあるビーズを二炭酸ジエチル (diethylpyrocarbonate, DEPC) 水30 μ lを加えて氷上で溶解, これにmRNA 0.5 μ gとキットに付属のランダムヘキサヌクレオチドプライマー (宝酒造, 東京) 0.5 μ g/ μ l, 10 μ lを加え, $1 \times$ TE緩衝液 (pH 6.8) で総量45 μ lに調整した. 次にGeneAmpTM PCR システム 9600-R (Perkin - Elmer Applied Biosystems Division, California, USA) を用いて65 $^{\circ}$ Cで10分間保持後20分かけて25 $^{\circ}$ Cまで冷却することでRNAの変性とプライマーのアニーリングを行い, さらに42 $^{\circ}$ Cで60分間保持しcDNAを合成させた後90 $^{\circ}$ C, 2分間で逆転写酵素を失活させた. 反応終了後に各プライマーと $1 \times$ TE緩衝液 (pH 7.0) 5 μ lを加え, 全量50 μ lとしPCRを行った. この時点で各2 mM デオキシヌクレオチド三リン酸 (deoxyribonucleotide triphosphate, dNTP), 10mM Tris-HCl (pH 9.0), 60mM KCl, 1.5mM MgCl₂, Taq DNAポリメラーゼ2.0単位の最終組成となる. 一方, 染色体DNAのPCRは抽出したDNA 0.1 μ gを鋳型として, 各プラ

Table 1. PCR primers for amplification of the HO-1 gene

Primer	Nucleotide Sequence	Coordinates*	Product size (bp)
5N	5'-CTCCCTCGAGCGTCCTC-3'	11	399
3N	5'-GGCTGGTGTGTAGGGGATG-3'	-410	
Del5	5'-GCCCTGGAGGAGGAGATTG-3'	258	153
3N	5'-GGCTGGTGTGTAGGGGATG-3'	-410	
Del5	5'-GCCCTGGAGGAGGAGATTG-3'	258	162
Del3	5'-GCGCTGCATGGCTGGTGTGA-3'	-419	
Del5	5'-GCCCTGGAGGAGGAGATTG-3'	258	331
Seq3	5'-GCAATGTTGGGAAGGTGAA-3'	-598	

*The cDNA nucleotide numbers are available from GenBank (accession numbers 135036).

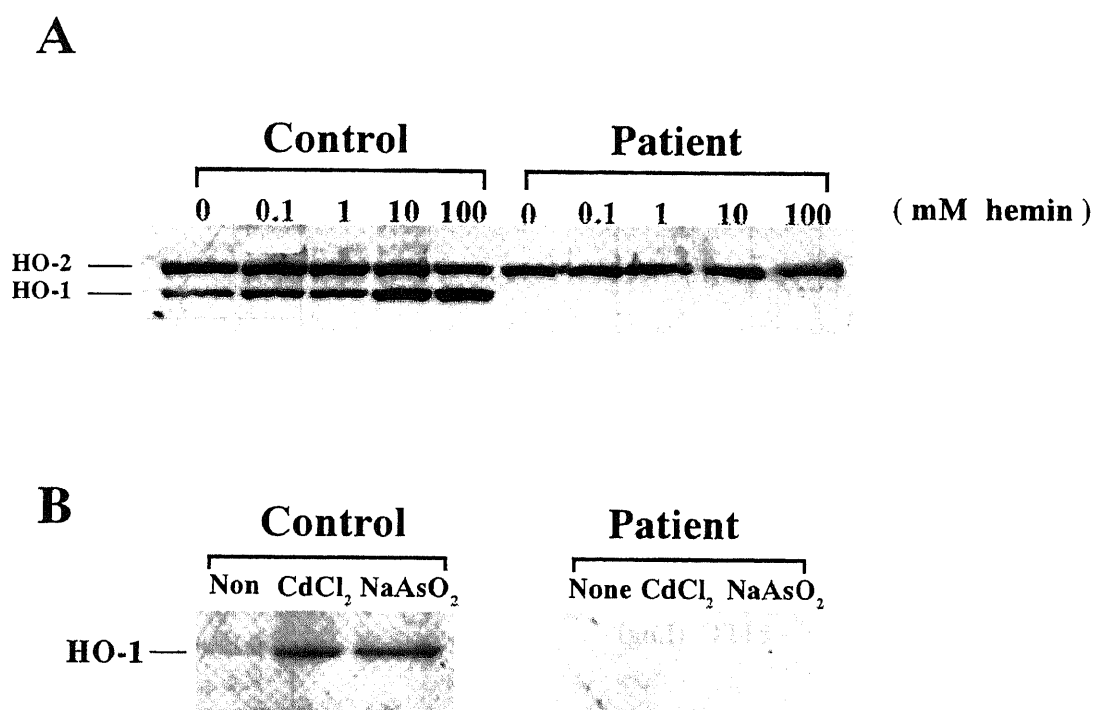


Fig. 3. Induction of HO-1 and HO-2 in LCL cells from the patient. (A) Immunoblotting of HO-1 induced in hemin-stimulated LCLs. LCL cells from the patient and a normal control were cultured in the absence, or in the presence of the indicated concentrations of hemin for 6 hr. Cell lysates were prepared as described in the Methods. Blotted membrane was reacted with the mixture of anti-HO-1 and anti-HO-2 antisera, followed by the reaction with HRP-conjugated anti-rabbit IgG. (B) Immunoblotting of HO-1 induced in LCL cells from the patient and a normal control, which were exposed to 10mM each of CdCl₂ or sodium arsenite for 6 hr.

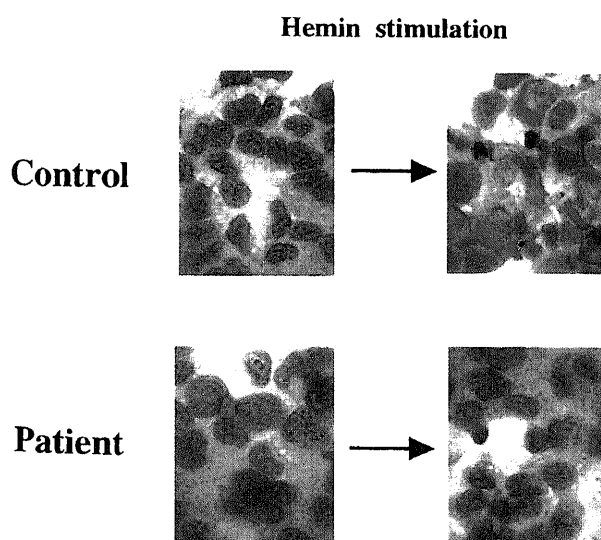


Fig. 4. Immunohistochemical staining of HO-1 in hemin-stimulated LCL cells. After blocking with normal goat serum, specimens of LCL cells were stained with appropriate dilutions of anti-HO-1 rabbit antiserum for 1h at room temperature. After washing the slides in Tris buffer, alkalinephosphatase conjugated goat anti rabbit antiserum was reacted for 30 min at room temperature. Alkalinephosphatase activity was visualized using Fast Red TR salt after further washing of the slides in Tris buffer.

イマー, 2mM の各 dNTP, PCR 反応緩衝液 (10mM Tris-HCl (pH 8.3), 50mM KCl, 1.5mM MgCl₂), Taq DNA ポリメラーゼ (Perkin - Elmer Cetus, Norwalk, USA) 1.25 単位を加えて全量 50 μ l で行った。尚, プライマー最終濃度は 5N/3N のみ 0.5 μ M, ほかのプライマー対では 0.2 μ M が至適条件であった。

反応は GeneAmpTM PCR システム 9600-R を使い, 94 $^{\circ}$ C \times 5 分の初期変性の後, 95 $^{\circ}$ C \times 30 秒, 58 $^{\circ}$ C で 30 秒, 72 $^{\circ}$ C \times 30 秒のサイクルを 35 \sim 40 サイクル行った。反応後 10 分の 1 容量のタイプ II 泳動緩衝液 (0.25% プロモフェノールブルー, 0.25% キシレンシアノール, 15% フィコール 400) を加え, 10 μ l を 3% アガロースゲル (H 14 - Takara, 宝酒造) に泳動しエチジウムブロマイド染色後, 紫外線照射装置 (トランスイルミネーター, フナコシ) 上で観察した。

5) PCRダイレクトシーケンス法による塩基配列の決定⁽³⁾⁽⁴⁾

PCR, RT-PCR 法により増幅した DNA 断片のうち, 5N/3N, Del 5/3R については DNA cycle sequencing kit (Perkin - Elmer Applied Biosystems Division) を用いてシーケンス反応を行い, DNA シーケンサ 371 A (Perkin - Elmer Applied Biosystems Division) にて解析した。シーケンスプライマーには各 PCR プライマーをそのまま使用し, 鋳型には反応後の PCR 反応液より マイクロコン-100 (宝酒造) にて過剰なプライマー, 塩基を除去したものを使用した。反応は GeneAmpTM PCR システム 9600-R を使用し, プレートを予め 95 $^{\circ}$ C に保温しておいた後 96 $^{\circ}$ C \times 15 秒, 50 $^{\circ}$ C \times 1 秒, 70 $^{\circ}$ C \times 4 分のサイクルを 25 回繰り返した。反応後はフェノール/クロロホルム抽出にて過剰なプライマー, 蛍光色素を除去しエタノール沈澱にて反応産物を回

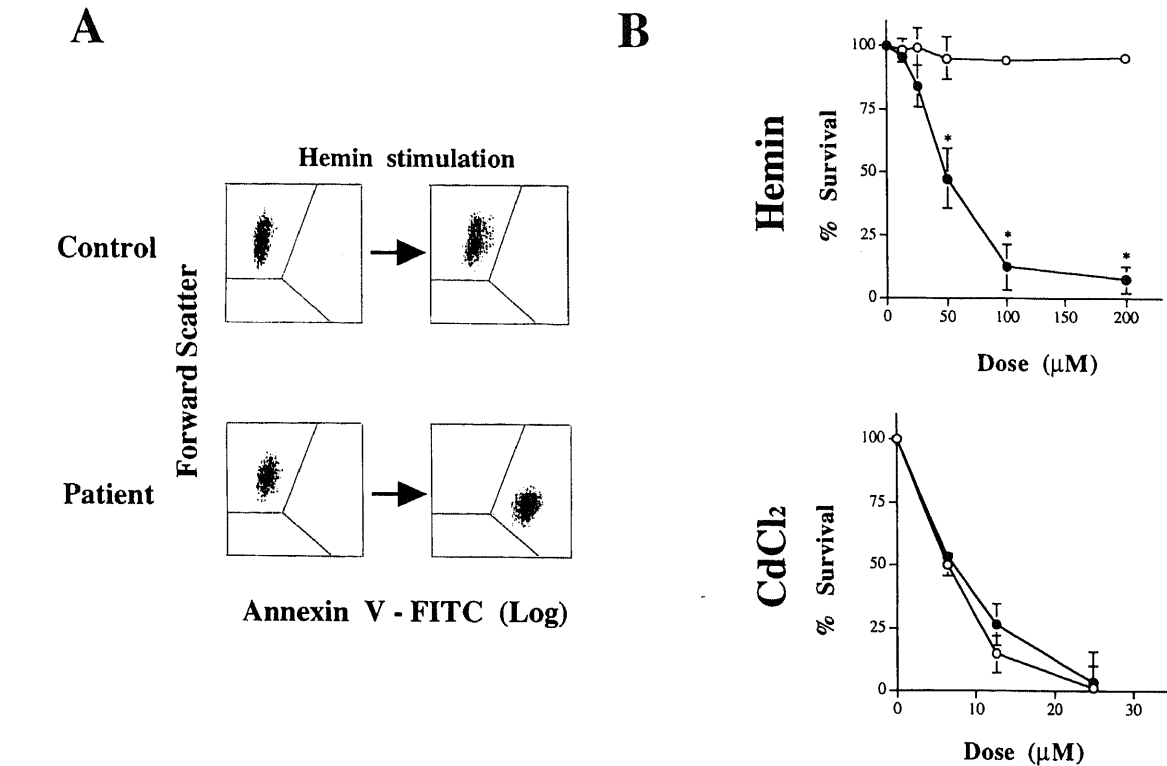


Fig. 5. Cytotoxicity assay in the patient and a control. (A) Identification of dead or apoptotic LCL cells. Cell death or apoptosis was identified by lowered forward light scatter and high annexin V binding using a flow cytometer. (B) Viability of LCL cells from the patient and a normal control. They were exposed for 24 hrs to several doses of hemin or CdCl₂. Percent survival was determined by comparing with the survival of cells cultured with medium alone. ●, Patient; ○, Normal control. Each datum represents the $\bar{X} \pm$ SD of three independent experiments. * $P < 0.05$.

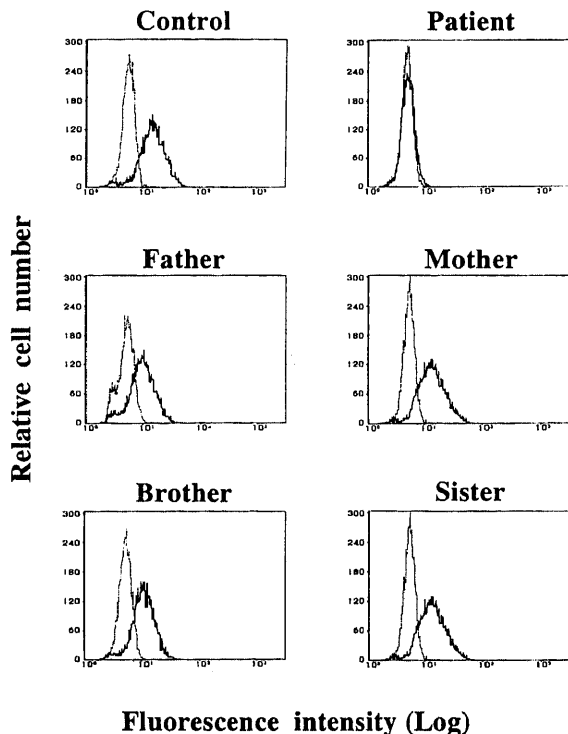


Fig. 6. Flowcytometric analysis of induced HO-1 expression in LCL cells from family members. LCL cells were treated with anti-HO-1 antiserum and further stained with FITC-conjugated anti-rabbit IgG. The fluorescence intensity was analyzed by a flow cytometer.

収した。シークエンスゲルは LongRanger (AT Biochem, 東洋紡績, 東京) を用い $1 \times$ Tris-ホウ酸-EDTA (TBE) 緩衝液にて 40 W 定電圧で泳動した。

成 績

1. 酸化ストレス刺激による患者LCLでのHO-1産生

患者LCLにおける各濃度のヘミン添加によるHO-1産生を正常対照と比較検討した。イムノプロットングにより正常対照では無添加ですでに微量ながらもHO-1が検出され、さらにヘミン添加後のHO-1は濃度依存性に増加していることが認められたが、これに対して患者ではHO-1は全ての条件下でいずれも検出されなかった。また構成酵素であるHO-2は患者、正常対照共にヘミン添加に関係なく検出された(図3A)。同様に亜硫酸や塩化カドミウム 10 mMの添加時でも患者LCLのHO-1産生は検出されなかった(図3B)。またヘミン添加後の患者培養細胞の標本を用いた免疫組織化学でも標本上の全てのLCLが抗ヒトHO-1抗体で染色されなかったことから、患者LCL全てにHO-1産生が欠如していることが明らかにされた(図4)。

2. 酸化ストレス刺激下でのLCL細胞傷害の比較

患者LCLおよび正常対照を各濃度のヘミン、塩化カドミウム添加培養液で24時間培養し、FITC標識アネキシンV結合を用いたフローサイトメトリー解析により平均細胞生存率の経時的な推移を比較した(図5A, B)⁴⁵⁾。図5Aでヘミン添加の例を示すが、ストレス刺激によりアポトーシスないしは細胞死に至ったLCLは前方散乱の低下と同時に強いアネキシンV結合指向

性を発現するようになる。平均細胞生存率は各LCL5,000個のうち、この細胞群を2パラメーター解析にて検出することで算出した。患者LCLと正常対照とを比較すると塩化カドミウムの添加では両者の生存率に有為差は認められなかった。しかしな

がらヘミン添加時では患者LCLの生存率は50 μ Mの濃度ですでに50%以下に、さらに100 μ Mでは13%, 200 μ Mでは8%にまで低下し、濃度依存性に細胞傷害が誘導されたのに対して、正常対照では200 μ Mのヘミン濃度でも殆ど細胞傷害は認めら

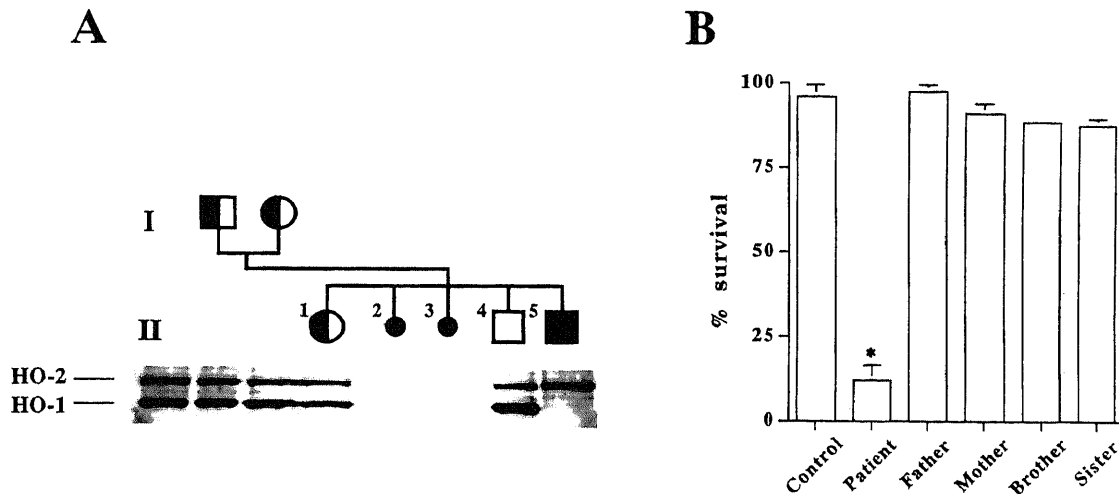


Fig. 7. Responses of HO-1 expression in hemin-stimulated LCL cells from family members. Immunoblotting of hemin-induced HO-1 (A) and hemin-induced cell death (B) in LCL cells from the family members after 24hrs exposure to 100 mM of hemin. Immunoblotting and cell viability analysis were performed as described in Fig. 3 and Fig. 5. Individuals II:2 and II:3 were not analyzed for HO expression because samples were not available. However, immunohistochemical study revealed normal HO-1 expression by hepatic Kupffer cells of individual II:3 (data not shown). Each datum represents the $\bar{X} \pm SD$ of three independent experiments. * $P < 0.0001$.

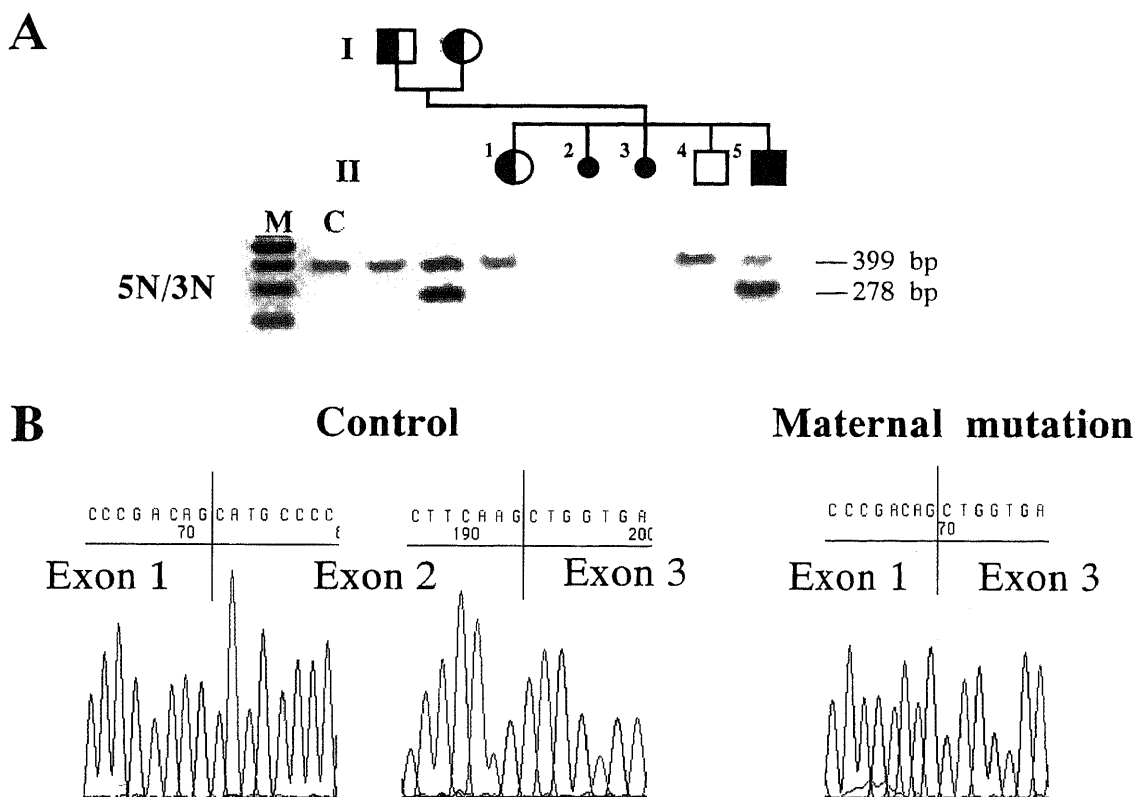


Fig. 8. Mutation analysis of HO-1 maternal allele. (A) RT-PCR analysis for HO-1 mRNA. The patient lane and his mother lane show a short extra band that is not seen in the control and other members of the family. Individuals II:2 and II:3 were not genotyped because no mRNA stock was available. M, 100 bp DNA ladder molecular marker; C, Normal control. (B) Parts of the sequencing pattern from maternal mutation allele and the normal control allele.

れなかった (図5 B).

3. 患者家系におけるヘミン刺激に対するHO-1産生および細胞傷害の相違

今回の研究では患者の父親, 母親, 姉, 兄についてもLCLを樹立しており, 100 μ Mの濃度に調製したヘミン添加培養液中で培養後に前述の方法を用いてHO-1検出と平均細胞生存率の算出を行い, 患者との比較検討を行った. フローサイトメトリー法による検討では患者LCLでのみHO-1産生が欠如していたが, 両親, 姉, 兄由来のLCLは全て正常対照と同様のHO-1産生を示した (図6). さらにイムノブロットングでは, ヘミン添加により患者以外の家族のいずれにおいてもHO-1が強く検出された (図7 A). 一方, ヘミン誘導性の細胞傷害は患者LCLでのみ認められ, 家族LCLを用いた場合には殆ど細胞傷害は誘導されなかった (図7 B).

4. RT-PCRによるHO-1遺伝子変異の検出

患者, 患者家族, および健康人のLCLより亜硫酸刺激で得られたmRNAを鋳型として, HO-1遺伝子翻訳領域の5'側を中心にプライマー対を設定してPCR反応を行った. 5 N / 3 NのRT-PCRでは患者と母親において正常対照とほぼ等長な増幅産

物だけでなく, 正常より120塩基対 (base pair, bp) ほど短い増幅産物も検出された (図8 A). また患者の正常長相当の産物ではエチジウムブロマイド染色において他の者と比べて発現量が明らかに低下しており, 両産物とも患者HO-1対立遺伝子対の別個に存在する変異を増幅している可能性を示唆していた.

5. ダイレクトシーケンスによるHO-1変異対立遺伝子の同定

5 N / 3 NのRT-PCRで得られた増幅産物をダイレクトシーケンスし, 塩基配列を決定した. 患者と母親から得られた短い増幅産物は278bp相当であり, 共にエクソン2が完全に欠失していた. 正常産物との差は121bpと, 泳動の結果に一致しており, 母親由来の変異対立遺伝子におけるスプライシングの過程でエクソン2スキッピングが生じたものと考えられた (図8 B). 一方, 患者の正常長相当の増幅産物は397bp相当であり, エクソン3内の2塩基欠失, 461delCAが認められた (図9 B). これは染色体DNAでもDel 5 / Del 3の2塩基欠失変異特異的なPCRを行うことで, 父親と姉において患者と同様に162bp相当の増幅産物が検出された (図9 A). またデータには示さなかったが染色体DNAからのDel 5 / Seq 3PCR増幅産物においてもダイレクトシーケンスを行い, 3人とも2本鎖DNAの一方に

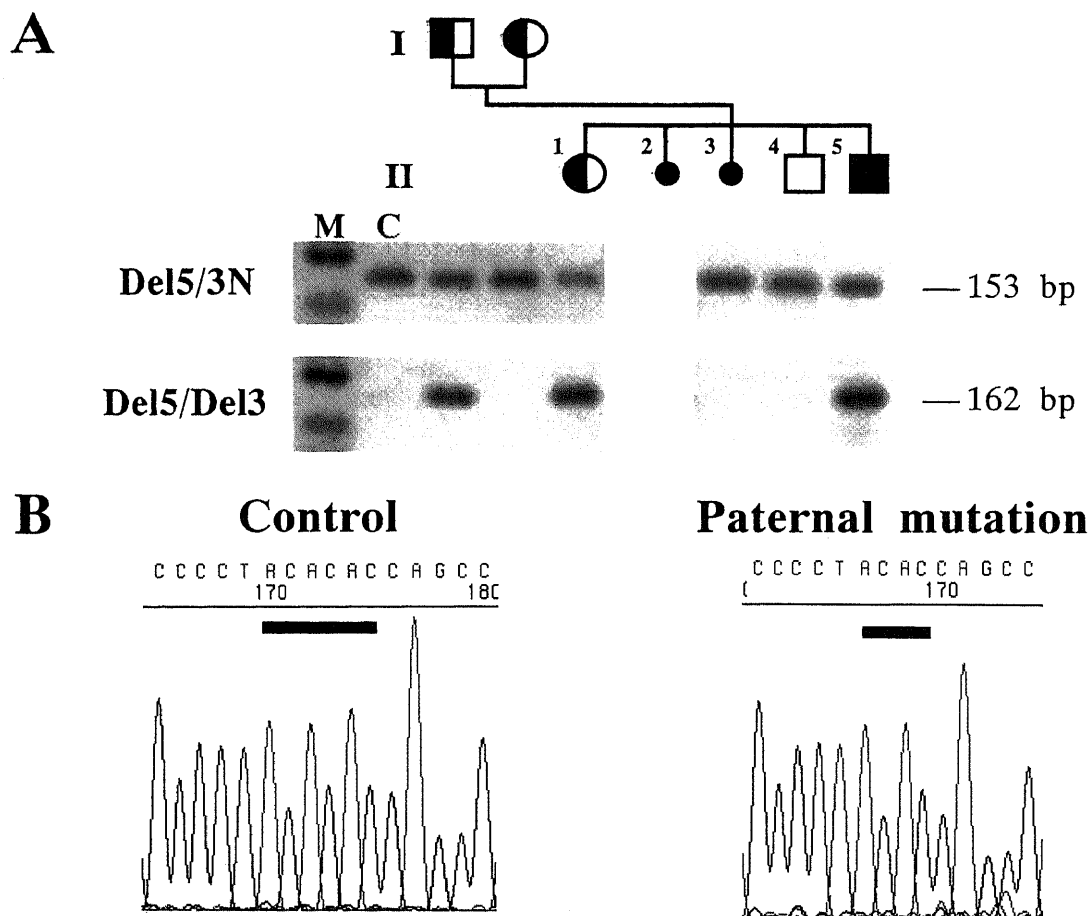


Fig. 9. Mutation analysis of HO-1 paternal allele. (A) PCR analysis for HO-1 genomic DNA using ARMS (amplification refractory mutation system). DNA control PCR primers (Del5 / 3N) amplify all DNA samples. Mutation specific PCR primers (Del5 / Del3) amplify the 2-nucleotide detected sequences. Individual II:2 was not genotyped because no DNA stock was available. M, 100 bp DNA ladder molecular marker; C, Normal control. (B) Parts of the sequencing pattern from paternal mutation allele and the normal control allele.

Table. 2 Mutant allele frequencies among general population

Sex	Number	Allele type (%)		
		D ⁺	S ⁺	D ⁻ /S ⁻
Male	56	0 (0)	0 (0)	112 (100)
Female	44	0 (0)	0 (0)	88 (100)

D⁺, Paternal mutation positive allele (Exon 3 2-nucleotide deletion); S⁺, Maternal mutation positive allele (Exon 2 skipping); D⁻/S⁻, Double negative allele.

のみ同変異が認められた。以上の結果から父親はエクソン3領域内の2塩基欠失を、母親はmRNAレベルでのエクソン2スキッピングを持つヘテロ接合体であり、患者は両遺伝子変異の複合ヘテロ接合体と同定された。どちらの変異もmRNAレベルでフレームシフトをきたして早期翻訳終結しており、これは患者HO-1が欠損していたイムノブロットングの結果を裏付けるものであった。また患者の姉は父親由来の変異対立遺伝子を持つ保因者であることが明らかとなった。

6. HO-1 両遺伝子変異の一般出現頻度の検討

今回同定された両変異に関しては非血縁者100名のスクリーニングにより一般出現頻度の検討も行った(表2)。結果は全例において両変異とも検出されなかった。

考 察

HO-1はヘム分解の律速酵素であるが、その代謝産物は様々な抗炎症作用を有している。ビリルジンは抗酸化作用と抗血小板活性を、一酸化炭素はcGMPを介した微小循環調節と抗血小板凝集作用を持つことが知られており、さらにフェリチンの増生は強力な酸化作用を持つ遊離鉄を除去することで生体防御に働いているものと提唱されている^{13) - 16)}。最近Poss³²⁾³³⁾らはHO-1ノックアウトマウスを用いて、HO-1の生体内における機能的意義を検討し報告している。彼らの検討によると、HO-1欠損ホモ型は既に胎生期で淘汰が働いて出生率が20%と低く、一定の週齢を超えると巨大分子群の酸化傷害、組織破壊を伴った慢性炎症を発症し、さらに内毒素に対する抵抗性が著明に低下するなど、種々のストレスに対する脆弱性が特徴的に観察される。さらに網内系臓器内で食細胞と実質細胞内への鉄沈着をきたし、貧血、肝脾腫を合併することから、HO-1ノックアウトマウスの病態形成には酸化ストレスによって集積した細胞内遊離鉄の排除と再利用の障害が重要な役割を果たしていることが報告されている。一方、本研究において解析したヒトHO-1欠損症においても、生検組織を用いた検討では腎尿細管や肝実質細胞における鉄沈着が確認され、これらの所見はヘム代謝酵素であるHO-1欠損による鉄再利用障害に特徴的と考えられる。しかし、ノックアウトマウスにおいて証明された実質臓器における鉄沈着は50週齢マウスでの観察のため長期間にわたる鉄代謝異常を反映していると考えられ、本症例における鉄沈着がそれほど顕著でないことから少なくとも幼児期においては鉄再利用障害と実質臓器における鉄沈着が主たる病態となるとは考え難い。最も重要な所見はむしろ血管内血球破壊、凝固・線溶系の亢進、腎組織における毛細血管内皮剥離などであり、その背景には全身性の血管内皮傷害があると考えられた。

HO-1は酸化ストレス、特にヘム蛋白に曝露された細胞を防御し、細胞死を阻止することが知られている。何らかの転機で血管内溶血が起こった際には血管内皮は持続的にヘム蛋白に曝露されて細胞傷害を受けると考えられるが、HO-1が欠損することによりヘム蛋白のクリアランスの遅延と血管内皮保護作用を有するビリルジンないし一酸化炭素の合成障害が相乗的に作用し、血管内皮傷害が増幅されるものと考えられる⁴⁰⁾。このような血管内皮傷害は新たな血球破壊を惹起し、ヘム蛋白はさらに増加するものと予想される。著明な白血球と血小板の増加、破碎赤血球の存在や凝固・線溶系の亢進など、本症例において観察された所見はいずれも血管内皮細胞の酸化ストレスに対する脆弱性に起因した持続的な内皮傷害によるものと考えられ、腎系球体毛細血管内皮で観察された形態学的変化はこのような病態を特徴的に反映している。一方、HO-1ノックアウトマウスでは肝脾腫が特徴的に観察されているが、本症例では脾臓が欠失しており無脾症と考えられた。しかし、心奇形を合併しない先天性無脾症は極めて稀であり、これまでに検索した限りではそのような症例の報告は確認できない。開腹生検時に左季肋下には癒痕病変が認められており、胎生期脾に何らかの細胞傷害転機が働き、HO-1による代償がないために退行したのかもかもしれない。逆に無脾症であることで傷害血球のクリアランスも遅延し、血中ヘム蛋白の増加や貧血の進行がある程度抑制され、患者の長期生存が可能になったものと推定される。

多種のストレス刺激によりHO-1のmRNA発現が促進することやビリルジン、フェリチン、一酸化炭素などのヘム代謝産物が抗酸化・抗炎症作用を持つ点からHO-1は生体の抗酸化機構の主幹をなしているものと考えられている。しかしながらHO-1mRNAの発現と酸化傷害の制御とは相関しないとする報告もある。Nutter⁴⁷⁾らはヒト乳癌細胞株であるMCF7を用いて、キノン化合物であるメナジオンを酸化ストレスとして負荷することでHO-1活性と細胞内外のビリルビン濃度変化、DNA損傷度との関連を調べ、メナジオン曝露によりHO-1発現が誘導されても細胞外のビリルビン濃度の上昇は認められなく、HO-1拮抗物質である錫プロトポルフィリンによるHO-1活性の減少によりむしろDNA損傷は減少し、細胞増殖抑制も軽減していたと報告している。一方、低濃度ヘムによりHO-1産生を誘導した後に酸化ストレスを加えることにより、細胞傷害が抑制されるとする報告もあり⁴⁸⁾、これまで論じられているHO-1の抗酸化作用には基質となるヘム蛋白の存在も不可欠であると予想された。そこで本研究ではLCLを用いてPoss³³⁾らに準じてヘミンと非ヘムである塩化カドミウムに曝露させ、酸化ストレス種別の細胞生存率を比較検討した。細胞生存率を比較すると、正常対照LCLは両酸化ストレス下でもHO-1を産生するにもかかわらず非ヘム刺激時では患者と差異なく用量依存的に細胞傷害が認められた。一方、ヘミン刺激時には正常対照LCLでは著明なHO-1産生が誘導されるのみでなく、細胞傷害が全く観察されなかった。HO-1欠損症LCLでは著明な細胞傷害が誘導されたことから、ヘミンにより誘導されるHO-1がLCLの細胞傷害抑制に重要な役割を果たしていることが推定された。生体内ではヘムを持った大量の赤血球が循環し、感染や出血などで局所での赤血球破壊がおこっているのはHO-1の作用発現の上でも合目的とも言える。非ヘム蛋白の酸化ストレスに対してもHO-1が産生される意義についてはこれまで言及されていないが、ヘムの存在が必須なのか、もしくは未知の機序による生体防御が

存在しているのかについては今後の検討が必要である。

ヒト HO-1 遺伝子はヒト第 22 番染色体長腕 12 領域に存在する単一コピー遺伝子であり、5つのエクソン配列と4つのイントロン配列で構成されている。これまで知られているヒト疾患では染色体遺伝子座に起こる病的変異が非コード配列に存在するのは約 15～20% 程度⁴⁹⁾で大部分はコード配列である点から、最初に症例家系での HO-1 mRNA 発現を RT-PCR 法にて検討した。正常対照と同一条件の 100 mM 亜硫酸刺激では反応 5 N/3 N で症例家族の全てに増幅産物の出現を認めたが、患者と母親では共に2つの長さの異なる増幅産物が検出され、2つのうち正常長相当の mRNA レベルは母親に比べて患者は明らかに低下していた。ダイレクトシークエンスにより短い増幅産物では母親由来のエクソン 2 スキッピングを、患者の正常長相当の増幅産物では父親由来のエクソン 3 領域の 2 塩基欠失を有することで、いずれもフレームシフトにより早期終止コドンとなっていた。このことから患者では両変異の複合ヘテロ接合体として発病したものと考えられた。患者の 2 塩基欠失変異を有する mRNA レベルが低下していた原因は定かではないが、転写調節領域の異常による転写量の減少よりも、むしろ同変異 mRNA の安定性に起因しているものであろうと解された。データには示さなかったが母親由来のエクソン 2 スキッピングの機序についてはイントロン 1、イントロン 2 に存在するスプライシング供与および受容部位付近の塩基配列の異常は認められず、現在は別の機序について検索している。症例家族では父親型変異特異的な PCR も併用することで表現型を調べた結果、父親と姉はエクソン 3 領域 2 塩基欠失の、母はエクソン 2 スキッピングのそれぞれヘテロ接合体であることが判明した。また非血縁健康人 100 名 200 対立遺伝子のスクーニングでは両変異とも検出されなかった事実より、本症例で認められた遺伝子異常は非病的な多型ではなく、病的な突然変異であると考えられた。以上の遺伝子解析の結果から、HO-1 欠損は常染色体劣性遺伝の形式を取るものと推察された。

以上、本症例は蛋白レベルでの HO-1 産生が欠損した世界第 1 例目のヒト HO-1 欠損症であることが確認された。また、HO-1 ノックアウトマウスと同様に種々の酸化ストレスに対して明らかな脆弱性が認められたことで HO-1 は生体防御の上で重要な役割を果たしていることが明らかにされた。本症例の経過中に認められた多くの症状や臨床所見は血管内皮傷害により説明可能であると考えられ、死亡原因も酸化ストレスへの脆弱性が関わっているものと想像されるが、高脂血症や異常な血管内溶血、無脾症が HO-1 欠損のみで発症し得るか否かに関してはさらに多くの症例による検討が必要である。また不全型の症例では種々の臨床症状を呈してくることが予想され、若年性関節リウマチなど小児期発症の慢性炎症性疾患群、鉄代謝異常を示す疾患群、血管内皮傷害症候群などにおいて HO-1 欠損症が関与している可能性があると考えられ、今後も追加症例の発見に努めたい。

結 論

ヒト HO-1 欠損症 1 家系に対して細胞傷害機構の解析ならびに HO-1 遺伝子異常の解析を行い、以下の結果を得た。

1. 今回、重度の発育遅延と共に原因不明の慢性炎症の持続を認めた症例から世界第 1 例目のヒト HO-1 欠損家系を発見した。

2. 症例家系の Epstein-Barr ウイルス形質変換 B 細胞株 (LCL) を用いた種々の酸化ストレスに対する HO-1 産生の検討では、症例のみで HO-1 蛋白産生が欠損していることを明らかにした。

3. ヘミン刺激により患者 LCL は濃度依存性に細胞傷害が誘導され、正常対照では高濃度ヘミン存在下でも細胞傷害は全く観察されなかった。

4. 遺伝子解析により患者は父親由来のエクソン 3 領域 2 塩基欠失と母親由来のエクソン 2 スキッピングを共に有する複合ヘテロ接合体と確定された。

5. 保因者である父母及び姉の表現型から本疾患は常染色体劣性遺伝の形式を取るものと推察された。また非血縁者 100 検体の検討では両変異とも検出されず、非病的な多型ではなく病的な突然変異であると考えられた。

6. 以上の結果より、HO-1 が生体内で酸化ストレスによる細胞傷害を抑制する上で極めて重要な役割を果たしていることが明らかとなった。

謝 辞

稿を終えるにあたり、研究の御指導と御校閲を賜りました金沢大学医学部小児科学講座小泉 晶一教授ならびに金沢大学医学部保健学科医学検査講座谷内江 昭宏教授に深甚なる感謝の意を表します。また、本研究の遂行に際し貴重な御助言を賜りました新井田 要助手ならびに東馬 智子先生に深く御礼申し上げます。さらに、御支援と御協力を頂きました金沢大学医学部小児科学講座の皆様から感謝いたします。なお、本研究の一部は第 101 回日本小児科学会総会・学術総会 (米子 1998) および第 102 回日本小児科学会総会・学術総会 (東京 1999) において発表した。

文 献

- 1) 浅田浩二. 生物の酸素ストレスに対する適応. フリーラジカルの臨床 (近藤元治, 大柳善彦, 吉川敏一編), 第 3 巻, 11-18 頁, 日本医学館, 東京, 1988
- 2) Coyle JT, Puttfarcken P. Oxidative stress, glutamate, and neurodegenerative disorders. *Science* 262: 689-695, 1993
- 3) Parsell DA, Lindquist S. The function of heat-shock proteins in stress tolerance: Degradation and reactivation of damaged proteins. *Annu Rev Genet* 27: 437-496, 1993
- 4) Zhu W, Roma P, Pellegatta F, Catapano AL. Oxidized-LDL induce the expression of heat shock protein 70 in human endothelial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 200: 389-394, 1994
- 5) Maines MD. Heme oxygenase: Function, multiplicity, regulatory mechanisms, and clinical applications. *FASEB J* 2: 2557-2568, 1988
- 6) Maines MD. Heme oxygenase system: A regulator of second messenger gases. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 37: 517-554, 1997
- 7) Burnett AL, Johns DG, Kriegsfeld LJ, Klein SL, Calvin DC, Demas GE, Schramm LP, Tonegawa S, Nelson RJ, Snyder SH, Poss KD. Ejaculatory abnormalities in mice with targeted disruption of the gene for heme oxygenase-2. *Nature Medicine* 4: 84-87, 1998
- 8) Muller RM, Taguchi H, Shibahara S. Nucleotide sequence and organization of the rat heme oxygenase gene. *J Biol Chem*

262: 6795-6802, 1987

9) Zakhary R, Gaine SP, Dinerman JL, Raut M, Flavahan NA. Heme oxygenase 2: Endothelial and neuronal localization and role in endothelium-dependent relaxation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 795-798, 1996

10) Kutty RK, Kutty GK, Rodriguez IR, Chader GJ, Wiggert B. Chromosomal localization of the human heme oxygenase genes: Heme oxygenase-1 (HMOX1) maps to chromosome 22q12 and heme oxygenase-2 (HMOX2) maps to chromosome 16p13.3. *Genomics* 50: 513-516, 1993

11) Kuwano A, Ikeda H, Takeda K, Nakai H, Kondo I, Shibahara S. Mapping of the human gene for inducible heme oxygenase to chromosome 22q12. *Tohoku J Exp Med* 172: 389-392, 1994

12) Keyse SM, Tyrrell RM. Heme oxygenase is the major 32-kDa stress protein induced in human skin fibroblasts by UVA radiation, hydrogen peroxide, and sodium arsenite. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 99-103, 1989

13) Stocker R, Yamamoto Y, McDonagh AF, Glazer AN, Ames BN. Bilirubin is an antioxidant of possible physiological importance. *Science* 235: 1043-1046, 1987

14) Nakagami T, Toyomura K, Kinoshita T, Morisawa S. A beneficial role of bile pigments as an endogenous tissue protector: Anticomplement effects of biliverdin and conjugated bilirubin. *Biochem Biophys Acta* 1158: 189-193, 1993

15) Ingi T, Cheng J, Ronnett GV. Carbon monoxide: An endogenous modulator of the nitric oxide-cyclic GMP signaling system. *Neuron* 16: 835-842, 1996

16) Juckett MB, Balla J, Balla G, Jessurun J, Jacob HS, Vercellotti GM. Ferritin protects endothelial cells from oxidized low density lipoprotein in vitro. *Am J Pathol* 147: 782-789, 1995

17) Taketani S, Kohno H, Yoshinaga T, Tokunaga R. Induction of heme oxygenase in rat hepatoma cells by exposure to heavy metals and hyperthermia. *Biochem Int* 17: 665-672, 1988

18) Yoshida T, Biro P, Cohen T, Mullar RM, Shibahara S. Human heme oxygenase cDNA and induction of its mRNA by hemin. *FEBS*: 457-461, 1988

19) Siow RCM, Ishii T, Sato H, Taketani S, Leake DS, Sweiry JH, Pearson JD, Bannai S, Mann GE. Induction of the antioxidant stress proteins heme oxygenase-1 and MSP23 by stress agents and oxidized LDL in cultured vascular smooth muscle cells. *FEBS Lett* 368: 239-242, 1995

20) Ewing JF, Maines MD. Rapid induction of heme oxygenase 1 mRNA and protein by hyperthermia in rat brain: Heme oxygenase 2 is not a heat shock protein. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 5364-5368, 1991

21) Kutty RK, Kutty G, Wiggert B, Chader GJ, Darrow RM, Organisciak DT. Induction of heme oxygenase 1 in the retina by intense visible light: suppression by the antioxidant dimethylthiourea. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1177-1181, 1995

22) Kutty RK, Nagineni CN, Kutty G, Hooks JJ, Chader GJ, Wiggert B. Increased expression of heme oxygenase-1 in human retinal pigment epithelial cells by transforming growth factor- β . *J Cell Physiol* 159: 371-378, 1994

23) Bissell DM, Hammaker LE. Cytochrome P-450 heme and the regulation of hepatic heme oxygenase activity. *Arch Biochem Biophys* 176: 91-102, 1976

24) Murphy BJ, Laderoute KR, Short SM, Sutherland RM. The identification of heme oxygenase as a major hypoxic stress protein in chinese hamster ovary cells. *Br J Cancer* 64: 69-73, 1991

25) Raju VS, Maines MD. Coordinated expression and mechanisms of induction of HSP 32 (heme oxygenase-1) mRNA by hyperthermia in rat organs. *Biochem Biophys Acta* 1217: 273-280, 1993

26) Inamdar NM, Ahn YI, Alam J. The heme-responsive element of the mouse heme oxygenase-1 gene is an extended AP-1 binding site that resembles the recognition sequences for MAF and NF-E2 transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun* 221: 570-576, 1996

27) Lavrosky Y, Schwartzman ML, Levere RD, Kappas A, Abraham NG. Identification of binding sites for transcription factors NF-kappa κ B and AP-2 in the promotor region of the human heme oxygenase-1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA* 91: 5987-5991, 1994

28) Alam J, Shibahara S, Smith A. Transcriptional activator of the heme oxygenase gene by heme and cadmium in mouse hepatoma cells. *J Biol Chem* 264: 6371-6375, 1989

29) Nath KA, Balla G, Vercellotti GM, Balla J, Jacob HS, Levitt MD, Rosenberg ME. Induction of heme oxygenase is a rapid, protective response in rhabdomyolysis in the rat. *J Clin Invest* 90: 267-270, 1992

30) Balla J, Jacob HS, Balla G, Nath KA, Eaton JW, Vercellotti GM. Endothelial-cell heme uptake from heme proteins: Induction of sensitization and desensitization to oxidant damage. *Proc Natl Acad Sci USA* 90: 9285-9289, 1993

31) Mosley K, Wembridge DE, Cattell V, Cook HT. Heme oxygenase is induced in nephrotoxic nephritis and hemin, a stimulator of heme oxygenase synthesis, ameliorates disease. *Kidney Int* 53: 672-678, 1998

32) Poss KD, Tonegawa S. Heme oxygenase 1 is required for mammalian iron reutilization. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10919-10924, 1997

33) Poss KD, Tonegawa S. Reduced stress defense in heme oxygenase 1-deficient cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 94: 10925-10930, 1997

34) Yachie A, Niida Y, Wada T, Igarashi N, Kaneda H, Toma T, Ohta K, Kasahara Y, Koizumi S. Human heme oxygenase-1 deficiency: Enhanced vascular endothelial cell injury upon oxidative stresses. *J Clin Invest*, 1998 (in press)

35) Thorley-Lawson DA, Mann KP. Early events in Epstein-Barr virus infection provide a model for B cell activation. *J Exp Med* 162: 45-59, 1985

36) Sakakibara R, Tominaga N, Sakai A, Ishiguro M. Electrophoretic separation of proteins on agarose gel - Application for direct immunization with a gel piece containing an antigen. *Anal Biochem* 162: 150-155, 1987

37) Iwai k, Miyawaki T, Takizawa T, Konno A, Ohta K, Yachie

- A, Seki H, Taniguchi N. Differential expression of bcl-2 and susceptibility to anti-Fas-mediated cell death in peripheral blood lymphocytes, monocytes, and neutrophils. *Blood* 84: 1201-1208, 1994
- 38) Martin SJ, CPM Reutelingsperger, McGahon AJ, Rader JA, RCAA von Schie, LaFace DM, Green DR. Early redistribution of plasma membrane phosphatidylserine is a general feature of apoptosis regardless of the initiating stimulus: inhibition by overexpression of bcl-2 and abl. *J Exp Med* 182: 1545-1556, 1995
- 39) Chomezynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162: 156-159, 1987
- 40) Newton CR, Graham A, Heptinstall LE, Powell SJ, Summers C, Kalsheker N, Smith JC, Markham. Analysis of any point mutation in DNA. The amplification refractory mutation system (ARMS). *Nucleic Acids Res* 17: 2503-2516, 1989
- 41) Kawasaki ES, Wang AM. Detection of gene expression. In Erlich HA (ed), *PCR Technology*, 1st ed, p89-97, W. H. Freeman and Company, New York, 1992
- 42) Kawasaki ES. Amplification of RNA. In Innis MA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds), *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 1st ed, p21-27, Academic Press, San Diego, 1990
- 43) Kelley JM. Automated Dye-Terminator DNA Sequencing. In Adams MD, Fields C, Venter C (eds), *Automated DNA Sequencing and Analysis*, 1st ed, p175-181, Academic Press, London, 1994
- 44) Tracy TE, Mulcahy LS. A Simple Method for Direct Automated Sequencing of PCR Fragments. In Ellingboe J, Gyllenstein UB (eds), *The PCR Technique: DNA Sequencing*, 1st ed, p145-152, Eaton Publishing Co, Massachusetts, 1992
- 45) 布上孝志. 急性感染症におけるリンパ球活性化の新たな指標: アネキシンV結合法によるアポトーシス指向性リンパ球の検出. *十全医学会雑誌* 107: 263-275, 1998
- 46) Balla G, Vercellotti GM, Muller-Eberhard U, Eaton J, Jacob HS. Exposure of Endothelial cells to free heme potentiates damage mediated by granulocytes and toxic oxygen species. *Lab Invest* 64: 648-655, 1998
- 47) Nutter LM, Sierra EE, NGO EO. Heme oxygenase does not protect human cells against oxidant stress. *J Lab Clin Med* 123: 506-514, 1994
- 48) Otterbein L, Sylvester LO, Choi AMK. Hemoglobin provides protection against lethal endotoxemia in rats: The role of heme oxygenase-1. *Am J Respir Cell Mol Biol* 13: 595-601, 1995
- 49) Cooper DN, Krawczak M, Antonarakis SE. In Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle D (eds), *The Metabolic and Molecular Bases of Inherited Disease*, 7th ed, p259-291, McGraw-Hill, New York, 1995

Analysis of Gene Mutation and Mechanism of Cell Injury in a Family with Heme Oxygenase-1 Deficiency
Hisashi Kaneda Department of pediatrics, School of Medicine, Kanazawa University, Kanazawa 920-8640 — J. J. J. Med Soc., **108**, 91 — 102 (1999)

Key words heme oxygenase-1, hemin, oxidative stress, annexin V, gene mutation

Abstract

Heme oxygenase-1 (HO-1; EC 1.14.99.3) is one of two isoforms of heme oxygenase and acts as a rate-limiting enzyme that catabolizes cellular heme to biliverdin, carbon monoxide, and free iron. It is rapidly induced by various oxidative stresses, thereby playing an important role in the self defence system and homeostasis of iron metabolism. Recently, analysis of HO-1 knockout mice revealed that defects in HO-1 activity led to growth retardation, cellular vulnerability to oxidative injury, anemia, and iron deposition in various organs. However, no human disease has so far been attributed to a primary deficiency of HO-1. Here, the first human case of HO-1 deficiency was identified in a 6-year-old boy with severe growth retardation and prolonged systemic inflammation. The patient and his family were evaluated for HO-1 protein expression, HO-1 gene mutation and cellular vulnerability to oxidative stresses. Immunohistochemistry and immunoblotting of Epstein-Barr virus-transformed lymphoblastoid cell line (LCL) revealed a complete lack of HO-1 production in the patient's LCL cells when they were exposed to various stimuli, including hemin, cadmium chloride and sodium arsenite. Moreover, LCL cells from the patient were extremely sensitive to cytotoxicity induced by hemin, whereas those from normal control or other family members were completely resistant to hemin-induced cell death. These findings indicate that HO-1 plays an important role in cellular protection from oxidative stresses. RT-PCR for HO-1 mRNA was performed using hemin-stimulated LCL cells. Two distinct bands of mRNA were detected in the patient and the direct sequencing of the PCR product revealed that the longer band derived from a paternal allele and carried a two-nucleotide deletion within exon 3, and that the shorter band derived from a maternal allele and had a complete skipping of exon 2. Both mutations caused frame shifts resulting in premature terminations in the synthesis of the HO-1 protein. Carrier detection in this family was performed by RT-PCR and by mutation-specific PCR to detect the exon 2 skipping and the two-nucleotide deletion within exon 3, respectively. The patient's sister was determined to be a carrier of the abnormal paternal allele. No mutant alleles were detected among 100 unrelated healthy controls. These findings confirm that the patient is a compound heterozygote of the two HO-1 mutations and it is strongly indicated that HO-1 plays significant protective roles in stress-induced cell injury, both in vivo and in vitro.